ОБЩИЕ ВОПРОСЫ

УДК 636:612.017.11/.12

О.В. Кухаркина, В.В. Дрыгин, О.А. Борисова, Т.В. Жбанова

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СТРОЕНИИ, ФУНКЦИЯХ И ИММУННОМ ОТВЕТЕ СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК

Контакт организма с окружающей средой происходит через две основные поверхности: кожу и слизистые оболочки. Доказано, что большинство возбудителей проникает в организм именно через слизистые покровы, площадь которых во много раз превышает площадь кожи, при этом слизистые оболочки играют роль наружного барьера и представляют собой первую линию защиты организма от патогенных факторов окружающей среды, таких, как бактериальные, грибковые, вирусные. Однако длительное время считалось, что слизистые выполняют только барьерную функцию и не участвуют в формировании иммунных реакций организма [6].

Впервые гипотеза о существовании защитных свойств слизистых была выдвинута в 20-х годах прошлого столетия А. Безредко; согласно ей антиинфекционная устойчивость слизистых оболочек возникает независимо от общего иммунитета и не связана с антителами, а чувствительными к определенным инфекциям являются только определенные ткани (к сибирской язве только кожа), поэтому их иммунизация приводит к общей иммунизации организма [2].

На сегодняшний день не вызывает сомнения, что слизистые покровы формируют особый тип иммунного ответа, обеспечиваемый секреторным IgA, сенсибилизированными лимфоцитами, а также возникновением и селекцией устойчивых к повреждающему агенту популяций клеток, которые защищают внутреннюю среду организма и сохраняют её постоянство путём тесного взаимодействия эволюционно выработанного комплекса неспецифических и специфических факторов, осуществляемых в тесной кооперации механизмов врождённого иммунитета с локальными адаптационными иммунными механизмами [11].

Направленность слизистых оболочек на защиту от внешних воздействий и поддержание гомеостаза организма определяет особенности их строения.

Наружный слой слизистых представлен реснитчатым эпителием, который в ротовой полости, пищеводе, анусе, а также преддверии носовой полости и конъюнктиве является многослойным, так как поверхность его испытывает значительные физические нагрузки. Слизистая оболочка носовой полости, трахеи, крупных и средних бронхов представлена многоядерным мерцательным эпителием, который выполняет функцию очищения и согревания вдыхаемого воздуха. В остальных слизистых (желудочно-кишечный, респираторный, урогенитальный тракты) эпителий является однослойным, что также связано с функциями, которые он выполняет [23].

Под эпителием располагается собственная пластинка, представленная слоем соединительной ткани. Ещё ниже может находиться тонкий слой мышечной ткани, образованный одним или несколькими рядами гладкомышечных клеток.

Мышечный слой отделяет слизистую оболочку от подслизистой основы, обильно испещрённой кровеносными, лимфатическими сосудами, простыми и сложными трубчатыми железами.

Подслизистая основа представлена рыхлой соединительной тканью и обеспечивает подвижность слизистой оболочки, способствует образованию складок .

Специфическая особенность слизистых оболочек – увлажненность их поверхности. Собственный железистый аппарат представлен одноклеточными (реже располагающимися группами) слизистыми железами, чередующимися с бокаловидными, эндокринными клетками. Железы слизистой оболочки относятся к экзогенным, выделяя на поверхность эпителия секрет и увлажняя его, они защищают слизистые от повреждения, адсорбируя инородные частицы. Формируя вязкий слой, слизь предотвращает проникновение патогенов внутрь организма.

Одним из важных факторов нормального функционирования слизистых оболочек являются микроорганизмы, населяющие слизистые, многие из них выполняют полезные функции – препятствуют заражению патогенными микробами, синтезируют необходимые витамины и т.д. Кроме того, микрофлора организма участвует в развитии и регуляции работы иммунной системы, стимулирует фагоцитарную активность макрофагов, регулирует синтез цитокинов и иммуноглобулинов, влияет на функциональную активность Т-, В-лимфоцитов и естественных киллеров [25].

Изменение состава и численности нормальной микрофлоры может сделать слизистую оболочку уязвимой по отношению к болезнетворным микроорганизмам. В экспериментах на животных было показано, что угнетение нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта под влиянием стрептомицина позволило легче инфицировать животных устойчивыми к стрептомицину штаммами сальмонеллы. Интересно, что если для инфицирования нормальных животных было необходимо 106 микроорганизмов, то было достаточно лишь десяти возбудителей для инфицирования животных, которым вводили стрептомицин [3].

Долгое время считали, что реакции, происходящие в слизистой оболочке, регулируются иммунной системой, а эпителиальные клетки выполняют исключительно барьерную функцию. Недавно ученые доказали, что эпителиальные клетки играют ключевую роль в этом процессе.

В экспериментах на культурах клеток продемонстрировали, что сигнал к началу синтеза IgA поступает к В-лимфоцитам от эпителиальных клеток слизистых оболочек. Клетки эпителия с помощью специфичных поверхностных рецепторов регистрируют чрезмерное размножение патогенных возбудителей и начинают синтезировать гуморальный фактор, который, в свою очередь, стимулирует синтез секреторного IgA В-лимфоцитами.

Кроме того, оказалось, что эпителиальные клетки вступают во взаимодействие с дендритными клетками иммунной системы, которые также начинают синтезировать данный гуморальный фактор, что приводит к значительному усилению синтеза секреторного IgA.

Непрерывный и не перемешиваемый слой, покрывающий поверхность всех слизистых оболочек организма, получил название слизи.

Слизь играет роль смазки, служит барьером, защищающим лежащие под ней эпителиальные клетки от действия факторов окружающей среды, в первую очередь механических, кроме того, слизь предотвращает повреждение клеток слизистых оболочек, например, от контакта с грубыми частицами пищи в желудке или от проникновения пыли в дыхательные пути. Она служит первым барьером против проникновения в организм бактерий, вирусов и других болезнетворных веществ, а также при участии ресничек эпителиальных клеток выводит из организма попавший чужеродный материал и слущивающиеся клетки эпителия [5].

Главным структурным компонентом слизи являются гликопротеиды, которые в последнее время получили название муцинов (от англ. *mucus* – слизь). Концентрация муцинов в слизи варьирует в зависимости от тракта и состояния организма: в слизи желудка человека она составляет около 50 мг/мл, а в цер-

викальной слизи коровы в период течки – всего 1 мг/мл.

Имеющиеся данные о строении и свойствах слизи, покрывающей все тракты организма, находят широкое практическое применение. Все больший интерес вызывает так называемая «иммунизация мукозального барьера», т.е. иммунизация слизи. В отличие от традиционной иммунизации, целью которой является увеличение титра IgG, задачей мукозальной иммунизации является увеличение титра IgA — антител, локализованных главным образом в слизи – первом барьере, стоящем на пути патогенов. Таким образом, можно ожидать, что в ближайшие годы секрет, продуцируемый слизистыми оболочками, будет привлекать к себе все большее внимание исследователей [10, 24].

Слизистые оболочки, заселённые множеством микроорганизмов, являются местом хрупкого равновесия между местной бактериальной флорой и защитными силами организма. При ослаблении защитных сил вследствие чрезмерной пролиферации бактерий или при снижении общей и особенно местной иммунной защиты равновесие нарушается, что способствует развитию очага инфекции в слизистой оболочке.

Слизистые оболочки обладают несколькими последовательно включающимися защитными системами. На первом этапе происходит *иммунное исключение* (мукоцилиарная защита), которое ограничивает заселение, сдерживает проникновение и препятствует фиксации патогенного возбудителя на слизистой благодаря секрету, обладающему противопатогенным действием. С помощью этого секрета антигены транспортируются за пределы организма [5].

Если первоначальные механизмы защиты не сработали, и патоген проник сквозь эпителиальный барьер, включается вторая линия защиты организма – *иммунный клиренс* (очищение), механизмы которого обезвреживают, инактивируют, деструктируют и удаляют живой или мёртвый антигенный материал. Иммунный клиренс представлен специфическими и неспецифическими механизмами защиты [21].

К неспецифическим факторам защиты относятся фагоциты (нейтрофилы, моноциты и макрофаги), клетки, выделяющие медиаторы воспаления (базофилы, тучные клетки, эозинофилы), натуральные киллеры, гуморальные факторы (комплемент, цитокины).

При воздействии патогенов клетки слизистых оболочек синтезируют неспецифические иммунные медиаторы – цитокины, которые играют ведущую роль в развитии иммунитета слизистых оболочек, действуя на биохимические мессенджеры, регулируя стимуляцию и торможение воспалительных реакций, инициируя иммунный ответ. Цитокины продуцируются лимфоцитами и макрофагами, встроенными в эпителий слизистой оболочки, под влиянием флогогенных стимулов. Например, источниками цитокинов в слюне являются сывороточный транссудат, слюнные железы и, кроме того, сами эпителиальные клетки слизистой оболочки. Примечательно, что содержание цитокинов в секретах слизистых оболочек не коррелируется с их уровнем в крови, что также указывает на автономность местного иммунитета [17].

Важным фактором неспецифической мукозальной иммунной защиты является адгезия, посредством которой организм контролирует численность бактерий. Механизмы адгезии весьма разнообразны и включают как неспецифические, так и специфические взаимодействия с участием специальных молекул – адгезинов (ICAM, VCAM, ELAM и др.) [7].

Важная роль в неспецифической защите слизистых оболочек принадлежит также лизоциму. Этот фермент, присутствующий во многих клетках, тканях и секреторных жидкостях организма, например в мокроте, слюне, сыворотке крови, лейкоцитах, курином белке, икре рыб, способствует уничтожению микроорганизмов, ограничивая их количество.

Патогены, прошедшие через мукоцилиарную защиту и не нейтрализованные неспецифическими факторами слизистых оболочек, активизируют Т- и В-лимфоциты, приводя к выработке антител и индуцируя развитие специфического иммунного ответа.

В мукозальной иммунной системе инициация и реализация иммунного ответа разделены. Первоначальное знакомство клеток слизистых оболочек с патогенами внешней среды происходит в индуктивных зонах, где антигены распознаются, фагоцитируются и презентуются Т- и В-клетками [6].

После стимуляции антигеном в фолликулах, значительно удалённых от поверхности слизистой, образуются заро-

дышевые центры, в которых происходит развитие локальных иммунных реакций и начальное формирование клонов антигенспецифических лимфоцитов. Окончательное созревание Т- и В-активированных лимфоцитов происходит после их перемещения в эффекторные зоны слизистой оболочки, представляющие собой скопление лимфоидных клеток в слое рыхлой соединительной ткани. Именно здесь развиваются клеточные и гуморальные иммунные реакции, а также другие антиген-специфические процессы.

В эффекторных зонах мукозальной иммунной системы также происходит трансформация В-лимфоцитов в IgA-продуцирующие плазматические клетки. IgA является доминирующим иммуноглобулином секретов организма (слюны, пищеварительного сока, выделений носовой полости) [13].

Выделение слизистых оболочек организма в обособленную иммунную систему подвигло ученых на разработку средств специфической профилактики болезней слизистых и создание мукозальных вакцин [1].

Использование в практике мукозальных вакцин имеет ряд преимуществ перед инъекционной вакцинацией. Прежде всего, удобство и простота проведения. Во-вторых, препараты, наносимые на слизистые оболочки, обладают низкой реактогенностью и способны создавать иммунитет входных ворот, который приводит к стимуляции всей мукозальной системы и развитию системного иммунного ответа. Так, воздействие на слизистую оболочку носоглотки способно вызвать местный иммунитет не только в ней, но и в слизистой оболочке влагалища и прямой кишки [4, 18].

Ещё одним важным свойством мукозальных вакцин является то, что они предупреждают развитие инфекционного процесса на всей поверхности слизистой, это приводит к уменьшению горизонтальной передачи возбудителя от носителя чувствительному субъекту [14].

На данный момент наиболее используемыми являются экспериментальные мукозальные вакцины для интраназального введения. После интраназальной иммунизации отмечается местное и системное увеличение специфических IgA и IgG, повышение уровня цитотоксических Т-лимфоцитов [8].

Главной проблемой при создании мукозальных препаратов является то, что они плохо взаимодействуют с клетками слизистой оболочки и стимулируют развитие слабой иммунной реакции. Это связано с тем, что инактивированные вирионы, используемые для создания мукозальных вакцин, не способны легко и быстро проникать в клетки слизистых, а при пероральном введении они теряют свои свойства. Все эти факторы привели к необходимости использовать мукозальные препараты совместно с веществами (адъювантами), усиливающими протективный эффект вакцинации [15, 22].

Семейство мукозальных адъювантов весьма разнообразно и включает в себя бактериальные токсины, бактериальные липопротеины, мукопептиды, олигонуклеотиды бактериальной ДНК, липополисахариды и их дериваты, некоторые цитокины, гидроокись и фосфат алюминия, сапонин [12].

Наиболее подробно изучены свойства бактериальных токсинов: термолабильного токсина *E. coli* и холерного токсина. В состав этих токсинов входят две субъединицы: субъединица-А, которая обладает ферментативной активностью, и субъединица-В, которая связывает гликолипиды рецепторов. Эти адъюванты повышают проницаемость слизистой оболочки, вызывают появление воспаления на первых этапах иммуногенеза [16].

В качестве мукозального адъюванта используют также иммуностимулирующий комплекс (ISCOM), который состоит из иммуностимулирующей фракции, источником которой является *Quillaja saponaria*, инкорпорированная в жировые частицы, образованные холестеролом, фосфолипидами и антигенами клеточных мембран [19].

Установлено, что ISCOM вакцины индуцируют смешанный Th-1 и Th-2 иммунный ответ. Они эффективны при интраназальном применении и запускают реакции как врожденного, так и приобретенного местного иммунитета.

Интересны попытки использовать в качестве основы для мукозальных вакцин бактерии нормальной микрофлоры – апатогенный штамм *Salmonella*, экспессирующий чужеродные вирусные белки, и рекомбинантный штамм-комменсал *Streptococcus gordonii*.

Весьма перспективным является использование в качестве адъюванта биоадгезивного катионного полисахарида – хитозана, состоящего из повторяющих-

ся единиц N-ацетил-Д-глюкозамина. Интраназальное введение мышам вакцины против гриппа типа В, содержащей данный адъювант, индуцировало образование IgG-, а также IgA-антител в носу и легких.

Таким образом, в последнее время разработке средств мукозальной специфической профилактики инфекционных болезней уделяется огромное внимание, и в ближайшем будущем можно ожидать новую «эру» – создание целого ряда мукозальных вакцин для широкого клинического использования [20].

Возросший в последние годы интерес к изучению феномена иммунитета слизистых требует усовершенствования методов его контроля и оценки качества используемых мукозальных вакцин.

При этом следует обратить особое внимание, на то что период полураспада секреторных иммуноглобулинов составляет 1-2 суток, что на много меньше, чем данный показатель для сывороточных иммуноглобулинов (период выведения 25-28 дней). Кроме того, проведенные анализы показывают, что количество секретов, вырабатываемых и покрывающих поверхность слизистых, в сутки достигает 10 литров, при этом практически ежедневно происходит смена иммуноглобулинового состава, в основном sIgA. Сыворотка крови, имеющая объемную характеристику в 2-3 литра, содержит медленно обновляющийся иммуноглобулиновый компонент. Все эти факты свидетельствуют, что количество sIgA в здоровом организме значительно превосходит данный показатель для всех классов сывороточных иммуноглобулинов, поэтому определение уровня секреторных иммуноглобулинов в слюне, слезной жидкости и других слизистых секретах является важнейшим компонентом в характеристике и диагностике иммунодефицитных состояний при инфекционно-воспалительной патологии.

В связи с этим разрабатываются и совершенствуются методы иммуноанализа на основе поли- и моноклональных антител для определения секреторных иммуноглобулинов. Стандартизован метод определения уровня иммуноглобулинов A, M, G в слюне и сыворотке крови с помощью твердофазного сэндвич-варианта иммуноферментного анализа.

Так как при развитии мукозального иммунного ответа в секреторных жидкостях происходит изменение содержания цитокинов, то этот показатель также используют для определения уровня иммунитета слизистых оболочек.

Существует несколько методов определения количества цитокинов в организме. Наиболее распространенный из них – определение медиаторов с помощью специфических антител. При этом в зависимости от используемой метки различают флюоресцентную, ферментную, радиоизотопную модификации метода.

Для определения цитокинов также используют электрохемилюминесцентный метод, метод проточной флюориметрии или цитофлюориметрии. Цитокины определяют также с помощью иммуногистохимических методов с использованием моноклональных антител [9].

Заключение

Из приведенных в обзоре данных следует, что изучение аспектов иммунитета, обеспечиваемого слизистыми оболочками, является в настоящее время одной из самых актуальных проблем иммунологии, а создание средств специфической профилактики, способных обеспечить защиту на участках слизистых, представляет собой перспективное направление научной деятельности.

Таким образом, мукозальная иммунная система, обеспечивая защиту от болезнетворных агентов, играет важную роль в поддержании нормального функционирования организма и требует более детального изучения её структурных компонентов и основных аспектов её действия.

РЕЗЮМЕ

В последнее время наблюдается повышенный интерес к особенностям строения, функциям и иммунным реакциям слизистых оболочек. Это связано с доказательством того, что многие патогены проникают в организм именно через слизистые, которые служат первым защитным барьером на пути инфекции, обеспечивая антивирусную и антибактериальную устойчивость.

В настоящей работе показаны общие принципы строения слизистых оболочек, изложены современные представления о концепциях мукозального иммунитета, рассмотрены механизмы развития иммунного ответа слизистых оболочек на внедрение патогенных агентов. Особое внимание уделено получению и применению мукозальных вакцин и адъювантов. Рассмотрены их иммунобиологические особенности и механизмы действия.

SUMMARY

Recently an intense interest has been taken in mucosa structure, functions and immune response features. It is associated with the fact that many pathogens are shown to able to penetrate into organism just through mucosa that serves as a primary protective barrier against infection providing the antiviral and antibacterial resistance.

General principles of mucosa structure, current perceptions of mucosal immunity concepts, mechanisms of the creation of mucosal immune response to the pathogenic agent penetration are described. The specific attention is paid to the preparation and application of mucosal vaccines and adjuvants. Their immunobiological features and action mechanisms are demonstrated.

Литература

1. Ада, Г. Вакцины, вакцинация и иммунный ответ. Пер. с англ / Г. Ада, А. Рамсей: М.: Медицина, 2002. 344 с.
2. Беляков, И.М. Иммунная система слизистых / И.М. Беляков // Иммунология. 1997. № 4. С. 7-13.
3. Биохимические и молекулярные аспекты симбиоза человека и его микрофлоры / В.Н. Бабин, И.В. Домарадский, А.В. Дубинин, О.А. Кондракова // Российский химический журнал. 1994. Т 38, № 6. С. 66–68.
4. Гендон, Ю.З. Вирусные мукозальные вакцины / Ю.З. Гендон // Вопр. вирусол. 1999. № 3. С. 100-105.
5. Костюкова, Н.Н. Начальный этап инфекционного процесса – канонизация и пути ее предотвращения / Н.Н. Костюкова // Журнал микробиол., эпидемиол., иммунол. 1989. № 9. С. 103-110.
6. Никоненко, А.Г. Слизистые оболочки – важный участок защитного барьера организма / А.Г. Никоненко // Здоров,я України. 2005. № 5. С.36-37.
7. Овод, В. В. Адгезивность бактерий / В. В. Овод, А. Е. Вершигора // Успехи соврем. биол. 1982. Т. 94, № 2. С. 313-324.
8. Першин, Б.Б. Вакцинация и местный иммунитет / Б.Б. Першин. Л: Медицина, 1985. 252 с.
9. Сенников, С.В. Методы определения цитокинов / С.В. Сенников, А.Н. Силков // Цитокины и воспаление. 2005. № 1. С.15-18.
10. Шварцман, Е.С. Местный иммунитет / Е.С. Шварцман, Л.Б. Хазенсон. Л.: Медицина, 1978. 224 с.
11. Ahlstedt, S. Mucosal immunity / S. Ahlstedt, B. Andersson, B. Carlsson // Ann. NY Acad. Sci. 1983. Vol. 409, № 1. P. 1-21.
12. Bergquist, C. Local and systemic antibody responses to dextran-cholera toxin B subunit conjugates / C. Bergquist, T. Lagergant, M. Lindblad // Infect. Immunol. 1995. Vol. 63. P. 2021-2026.
13. Brandtzaeg, P. Basis mechanisms of mucosal immunity / P. Brandtzaeg // Immunologist. 1995. № 3. P. 89-96.
14. Davis, S.S. Nasal vaccines / S.S. Davis // Adv. Drag. Deliv. Rev. 2001. Vol. 51. P. 21-42.
15. De Haan, A. Mucosal immunoadjuvant activity of liposome's: role of alveolar macrophages / A. De Haan, G. Groen, J. Prop // Immunology. 1996. Vol. 89. P. 488-493.
16. De Haan, L. Cholera toxin and related enterotoxins: a cell biological and immunological perspective / L. De Haan, T. Hirst // J. Nat. Toxins. 2000. Vol. 9, № 3. P. 281-297.
17. Hannat, D. Mucosal immunology: overview and potential in veterinary species / D. Hannat // Vet. Immunol. Immunopathol. 2002. Vol. 87. P. 265-267.
18. Holmgren, J. Mucosal immunity and vaccination / J. Holmgren // FEMS Microbiol. Immunol. 1991. Vol. 4, №1. P. 1-9.
19. Kersten, G.F.A. Liposomes and ISCOMs / G.F.A. Kersten, D.J.A. Cromelin // Vaccine. 2003. Vol. 21. P. 915-920.
20. McGhee, J.R. The mucosal immune system: From fundamental concepts to vaccine development / J.R. McGhee, J. Mestecky, M.T. Dertzbaugh // Vaccine. 1992. Vol. 10. P. 75-88.
21. Murphy, B.R. Mucosal immunity to viruses / B.R. Murphy // Mucosal Immunology. San Diego: Acad. Press, 1999. P. 695-707.
22. Ogra, P.L. Vaccination strategies for mucosal immune responses / P.L. Ogra, H. Faden, R.C. Welliver // Clin. Microbiol. Rev. 2001. Vol. 14. P. 430-445.
23. Polito, A. Epithelil cells as regulators of airway inflammation / A. Polito, D. Proud // J. Allergy Clin. Immunol. 1998. Vol. 102 P. 714—718.
24. Ruedl, C. Features of oral immunization / C. Ruedl, H. Wolf // Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 1995. Vol. 108. P. 334-339.
25. Tannock, G.W. Normal Microflora / G.W. Tannock. NY: Chapman and Hall, 1995 340 p.

УДК 619:578.831.2:636.3:616-036.22

Е.В. Капускин

КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ РИСКА ЗАНОСА ЧУМЫ МЕЛКИХ ЖВАЧНЫХ НА ТЕРРИТОРИЮ РОССИИ

Введение

Анализ риска – аналитическая процедура, используемая для определения и расчета вероятности ввоза в страну-импортер различных источников риска – патогенов с импортируемым товаром, например, биологического происхождения.

К таким патогенам в анализе риска относят биологические агенты, например, микроорганизмы (и их токсины), являющиеся возбудителями заболеваний людей, животных или растений; различные химические агенты токсического, онкогенного или другого воздействия [3, 4].